

研究报告

大肠杆菌血脑屏障侵袭基因 *ibeB* 的稳定转染能够促进 HeLa 细胞片状伪足的形成*

赵伟东 陈誉华**

(中国医科大学发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 为进一步探讨大肠杆菌血脑屏障侵袭基因 *ibeB* 的生物学特性, 将 *ibeB* 基因克隆至真核表达载体, 采用稳定转染的方法, 对 *ibeB* 基因在 HeLa 细胞中的表达所产生的影响进行了研究. 结果发现: 经 *ibeB* 基因稳定转染的 HeLa 细胞向外周伸展, 细胞骨架的组分——微丝发生了重新排布, 形成了明显的片状伪足, 细胞周边形成较多的膜皱褶结构; 细胞对底物的粘附能力和伸展能力显著增强; 细胞的粘着斑标志性蛋白 Vinculin 表达增强. 这些结果为研究片状伪足的形成机制提供了模型.

关键词 *ibeB* 基因, 大肠杆菌, HeLa 细胞, 细胞骨架, 片状伪足

学科分类号 Q78

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 是新生儿脑膜炎最常见的致病菌^[1], 其引起脑膜炎的首要条件是, 血液中的大肠杆菌必须穿过由脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMEC)等组成的血脑屏障. 我们在研究致脑膜炎大肠杆菌 K1 株穿过血脑屏障机制的过程中, 分离鉴定了一个 *E.coli* K1 侵袭脑微血管内皮细胞、穿越血脑屏障相关的基因, 并命名为 *ibeB* (*ibe* 取自 invasion of brain endothelial cells)^[2]. *ibeB* 的开放阅读框(ORF)大小为 1 383 bp, 推断的编码蛋白为 50 ku, 且 *ibeB* 基因缺失的 *E.coli* K1 菌株对脑微血管内皮细胞和血脑屏障体内模型的侵袭能力显著下降. 进一步研究发现, 50 ku 的 *IbeB* 蛋白前体可自我加工成 34 ku 的定位于细菌外膜的成熟蛋白^[3], 这与细菌的 V 型分泌有一定的相似性, 提示 *IbeB* 蛋白可能在 *E.coli* K1 侵袭真核细胞的过程中进入真核细胞内部并发挥作用. 鉴此, 本研究采用基因转染的方法, 利用真核表达载体, 通过对 HeLa 细胞进行稳定转染, 分析外源性 *ibeB* 基因的表达对 HeLa 细胞生物学特性的影响, 观察到 *ibeB* 基因的稳定转染能够促进 HeLa 细胞片状伪足 (lamellipodia) 形成的新现象.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株. pcDNA3.1/HisC 载体购自 Invitrogen 公司, DH5 α 菌株由美国南加州大学医学院惠赠. HeLa 细胞 (人宫颈癌上皮细胞系) 为本教研室保存的细胞株.

1.1.2 主要试剂. 限制性内切酶 *EcoR* I、*BamH* I 和 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司), QIA Midiprep Kit (QIAGEN 公司), FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche 公司), His-tag 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology), Vinculin 多克隆抗体 (Neomarker), 纤连蛋白 (fibronectin)、罗丹明标记的毒伞素 (Rhodamine-phalloidin) 购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. HeLa 细胞培养于 10% 新生牛血清, DMEM 培养液, 置于 37 °C, 5 % CO₂, 100% 湿度的细胞培养箱中培养. 每 2~3 天更换新鲜培养液, 待细胞在培养瓶底面生长至 90% 左右时, 用含 0.25% 胰蛋白酶的细胞消化液消化细胞后, 加入培养液, 吹打成单细胞悬液后, 用培养液将其稀释 3 倍, 分瓶继续培养.

1.2.2 pcDNA/HisC-*ibeB* 真核表达载体的构建. 分别以 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切 pcDNA3/7C (含有 *ibeB* 基因)^[2] 和 pcDNA3.1/HisC 质粒 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物, 并回收相应的 DNA 片段. 以 T4 DNA 连接酶将 *ibeB* 基因 (1.7 kb) 克隆至 pcDNA3.1/HisC, 命名为 pcDNA/HisC-*ibeB*. 经双酶切验证克隆是否成功, 并测序验证重组质粒读码框的正确性.

*国家自然科学基金资助项目 (30170053, 30170470, 30370702).

** 通讯联系人.

Tel: 024-23260246, 024-23256666-5019

E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2004-09-17, 接受日期: 2004-10-30

1.2.3 稳定表达 *ibeB* 基因的细胞株建立和培养. HeLa 细胞培养于 100 mm 培养皿中. 当细胞密度达到 50%~80 % 时进行转染. 转染方法参照 FuGENE 6 Transfection Reagent 说明书, 简述如下: 在无菌 EP 管中依次加入 388 μ l 无血清无抗生素培养液, FuGENE 6 转染试剂 12 μ l, pcDNA/HisC-*ibeB* 质粒 DNA 8 μ g. 混匀后室温放置 45 min, 将混合液逐滴加入细胞培养液中, 培养 24~48 h 后换液, 并加入 G418 筛选, 每隔 2 天换液. 当出现细胞克隆后, 通过单克隆化操作逐步扩大培养至可以稳定传代. 利用蛋白质印迹(Western blot)方法, 以 His-tag 单克隆抗体检测 His6-IbeB 融合蛋白的表达情况.

1.2.4 细胞形态观察. 利用 OLYMPUS 倒置显微镜, 对稳定表达 *ibeB* 基因的细胞克隆的细胞形态进行观察, 并选择合适的视野, 以 135 胶卷相机照相记录活细胞的形态.

1.2.5 荧光法观察微丝. 将细胞以适当的密度接种于无菌处理的盖玻片上, 待细胞充分伸展并贴壁后继续培养过夜. 取出盖玻片, PBS 漂洗后, 3.7% 甲醛室温固定 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 利用 0.2 % Triton X-100 透化 2 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 10 % BSA 室温封闭 30 min, 罗丹明标记的毒伞素室温避光染色 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min. 去离子水略洗一下盖片后, 以 95 % 甘油封片, 分别利用普通荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察, 使用数码相机进行图像采集.

1.2.6 细胞伸展试验 (cell spreading assay). 按照文献[4]中的方法, 常规方法消化细胞, 将细胞以 50% 的密度接种于盖玻片上, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱培养, 分别于接种后 5 min 和 1 h 观察细胞的伸展情况, 照相记录后, 使用 Image Tools 软件分析细胞的面积. 重复 3 次, 比较细胞面积的变化.

1.2.7 细胞粘附试验 (cell adhesion assay). 参照文献[5]的方法, 稍做修改后进行细胞粘附试验. 简述如下: 将 96 孔板以 10 mg/L 的纤连蛋白于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 1% BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭 4 h 后, 将消化后细胞密度调整至 2×10^5 /ml, 按照 2×10^4 个 / 孔进行接种, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 100%湿度的 CO₂ 孵箱中培养 1 h, 弃去培养基, 以 PBS 轻柔洗 3 次, 3.7% 多聚甲醛室温固定 10 min, 加入 1% 结晶紫溶液室温染色 1 h, PBS 冲洗 4 次, 空气中干燥 10 min, 加入 0.5% Trinton X-100 溶解过夜后, 利用酶标仪于 595 nm 检测吸光度值.

1.2.8 免疫荧光法显示 Vinculin 表达情况. 细胞接

种于盖玻片上, 3.7% 甲醛固定 30 min, 0.2% Triton X-100 透化 2 min. 10% BSA 室温封闭 30 min, vinculin 抗体染色 1 h, PBS 洗 3 次, 荧光素标记的二抗染色 1 h, PBS 洗 3 次, 去离子水略洗一下盖片后, 95% 甘油封片, 于荧光显微镜下观察.

1.2.9 统计学分析. 利用 SPSS 11.0 对数据进行 *t* 检验.

2 结 果

2.1 稳定表达重组 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞克隆的获得

利用蛋白质印迹方法, 用 His-tag 抗体鉴定稳定转染所得到的 HeLa 细胞克隆中是否表达 His6-IbeB 融合蛋白. 结果显示, 5 个转基因 HeLa 细胞克隆中均有 IbeB 蛋白的表达, 而对照组则没有(图 1).

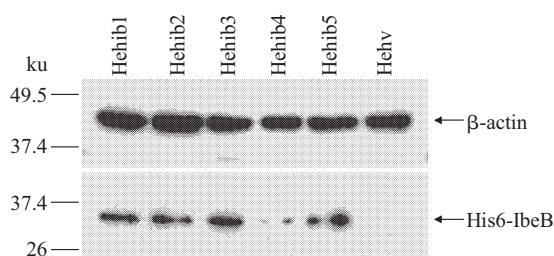


Fig.1 Identification of His6-IbeB fused protein expression in transfected HeLa cells

Hehib1~5: Different HeLa cell clones stably transfected with *ibeB* gene; Hehv: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector.

2.2 *ibeB* 基因稳定转染 HeLa 细胞的形态学变化

在得到了稳定转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞克隆并对其进行鉴定之后, 选择 *ibeB* 基因表达呈阳性的细胞, 在倒置相差显微镜下观察细胞形态. 结果显示, 与对照组即转染 pcDNA3.1/HisC 空载体的 HeLa 细胞相比, 稳定转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞出现了较明显的形态变化(图 2), 表现为细胞向外

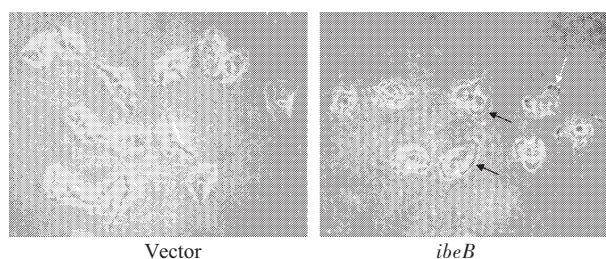


Fig.2 The morphological changes of HeLa cells expressing *IbeB*

Vector: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector; *ibeB*: HeLa single-clone cells stably transfected with *ibeB* gene (Black arrows points to the lamellipodia, white arrow points to the membrane ruffles) (50 $\times$).

周伸展，形成明显的片状伪足，在片状伪足的边缘出现较多的膜皱褶 (membrane ruffles)，细胞面积变大，细胞的核浆比变小，且细胞和细胞之间的聚集倾向明显减弱，细胞分布较为分散。

2.3 转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的微丝变化
细胞骨架是真核细胞维持形态的主要结构成分^[9]。稳定转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞所呈现的明显形态变化促使我们进一步观察细胞骨架的改变(图3)。

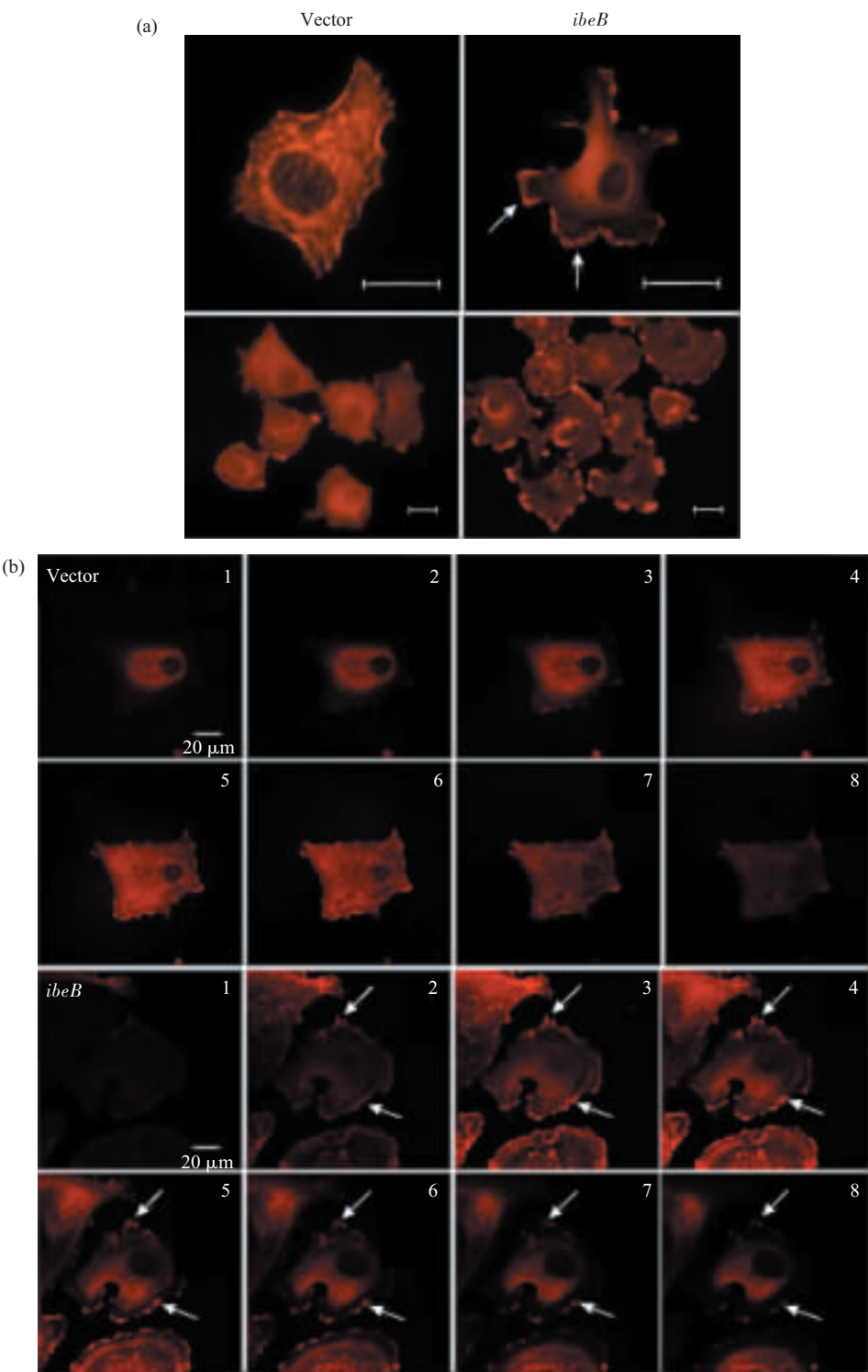


Fig.3 The actin filament of HeLa cells expressing *IbeB* visualized by immunofluorescence
Immunostained cells were visualized using fluorescence microscopy(a) and confocal laser scanning microscopy (b) (slice thickness: 0.5 μm). Vector: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector; *ibeB*: HeLa single-clone cells stably transfected with *ibeB* gene. Membrane ruffles at the edge of lamellipodia are shown by white arrows.

利用荧光标记技术, 通过罗丹明标记的毒伞素对细胞骨架的主要组分——肌动蛋白微丝 (actin filament) 观察发现, 与对照组相比, 转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的微丝发生了重新分布. 微丝向细胞周边延伸, 从而形成明显的片状伪足以及位于片状伪足边缘的膜皱褶结构; 横贯细胞的应力纤维 (stress fiber) 数量减少, 细胞皮质区的肌动蛋白纤维 (cortical actin filament) 基本消失 (图 3 a). 我们还利用共聚焦激光显微镜, 通过对细胞进行多层面的扫描, 进一步观察了转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的膜皱褶变化. 由图 3 b 可以看出, 当片状伪足向细胞外周伸出一定距离后, 其前缘不能与底物相粘附, 就会折回至细胞的背部, 这样就在细胞背面形成了特征性的膜皱褶结构. 可以看出, *ibeB* 基因的稳定表达可以使 HeLa 细胞形成更为明显的片状伪足, 进而在细胞周边形成较多的膜皱褶.

2.4 转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的伸展能力增强

在体外培养的贴壁型生长细胞中, 片状伪足通常在细胞伸展的过程中形成^[7]. 为此, 我们观察了细胞的伸展过程. 结果显示, 与转染空载体的对照组相比, 转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的伸展能力明

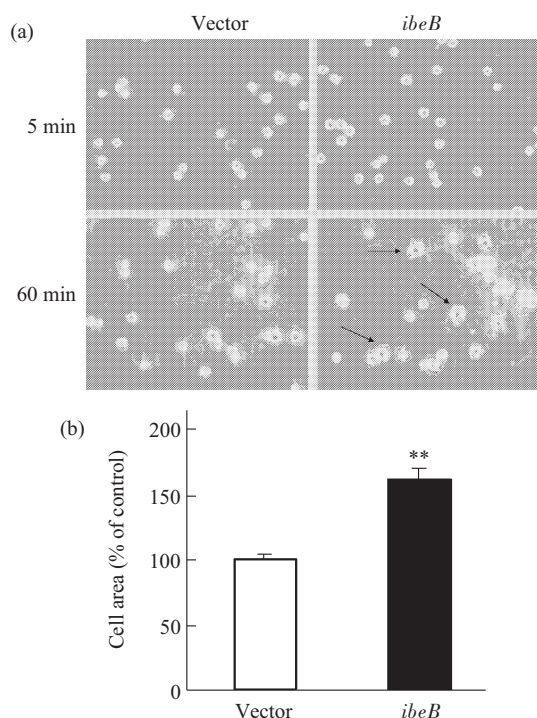


Fig.4 Cell spreading ability analyzed by cell spreading assay

(a) Cell spreading visualized by phase-contrast microscope (Black arrows points to the lamellipodia). (b) Statistical analysis of three independent experiments. Each number represents $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments, ** $P < 0.01$. Vector: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector; *ibeB*: HeLa single-clone cells stably transfected with *ibeB* gene.

显增强, 在贴壁 1 h 后的细胞面积是对照组细胞的 1.6 倍左右, 在细胞周围可以观察到较明显的片状伪足 (图 4).

2.5 转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞对底物的粘附能力及其 Vinculin 的分布变化

在贴壁型细胞中, 通常认为细胞对底物的粘附是片状伪足稳定形成的基础^[8]. 为此, 我们分析了转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞对底物的粘附能力. 结果显示, *ibeB* 基因的稳定转染可以增强 HeLa 细胞对底物纤连蛋白的粘附能力 (图 5). Vinculin 是细胞对底物粘附过程中所形成的粘着斑 (focal adhesion) 的主要组分^[8,9], 实验中观察到转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的 Vinculin 呈现特征性的斑块状结构, 主要分布于细胞边缘, 而对照组细胞所显示的斑块状结构较小, 胞浆表达较明显 (图 6).

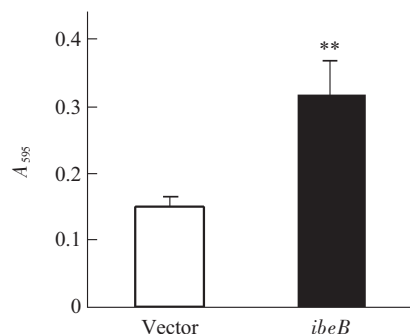


Fig.5 Cell-substratum adhesion ability analyzed by cell adhesion assay

Vector: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector; *ibeB*: HeLa single-clone cells stably transfected with *ibeB* gene. Each number represents $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments, ** $P < 0.01$.

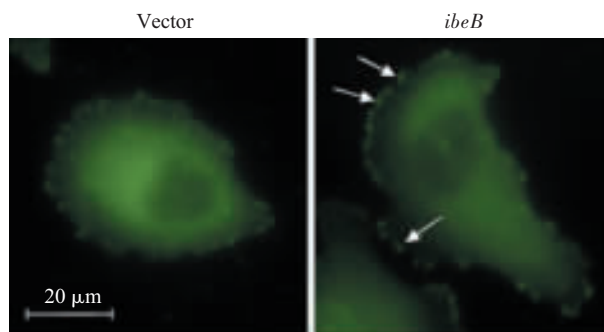


Fig.6 The vinculin expression of HeLa cells expressing *ibeB* visualized by immunofluorescence

Vector: HeLa cells stably transfected with pcDNA3.1/HisC vector; *ibeB*: HeLa single-clone cells stably transfected with *ibeB* gene. White arrows points to the typical dot-like focal adhesions.

3 讨 论

近年来,在研究病原菌侵袭真核宿主细胞的过程中,发现某些细菌通过作用于宿主细胞的细胞骨架系统而完成其侵袭过程(细菌进入宿主细胞内)^[10].在该领域的研究中,已鉴定了多个可直接被分泌到真核细胞内的细菌效应分子,例如, EspB 是肠致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC) 的一种分泌蛋白,它可以通过细菌的Ⅲ型分泌系统进入 HeLa 细胞质中,引起 HeLa 细胞发生细胞骨架变化^[11].本实验在致脑膜炎大肠杆菌 K1 株中首先发现,其效应分子 IbeB 蛋白可以引起 HeLa 细胞的细胞骨架重新组装(片状伪足出现).这些结果不仅为研究细菌的侵袭机制积累了资料,而且提示可以利用致病菌基因组作为“分子探针”研究真核细胞的细胞骨架调控机制.

我们利用基因转染的方法,选择在基因转染研究中常用的人宫颈癌上皮 HeLa 细胞,观察了外源性表达 *ibeB* 基因对 HeLa 细胞生物学特性的影响.结果发现,与转染 pcDNA3.1/HisC 空载体的 HeLa 细胞即对照组相比, IbeB 蛋白对外胚层来源的 HeLa 细胞的细胞形态有较明显的影响,引起了 HeLa 细胞向外伸展的现象.此外,我们还在研究中发现 *ibeB* 基因转染对内胚层来源的人胰腺癌细胞系 JF305 和中胚层来源的人骨肉瘤细胞系 MG63 细胞形态的影响不明显(结果未示).这提示我们: *ibeB* 在不同的真核细胞系中所引起的生物学效应是不同的,即 IbeB 蛋白能够特异性地引起人宫颈癌上皮细胞 HeLa 片状伪足的形成.

目前认为,片状伪足是由网状排列的微丝形成细胞表面的特化结构,它是肌动蛋白动态组装形成微丝的主要部位,应力纤维、丝状伪足(filopodia)和微刺(microspike)等结构均在此处形成^[12].因此,本实验分析了转基因 HeLa 细胞的细胞骨架组分——微丝的变化.结果发现,转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞的微丝发生了重新分布,呈现出明显的片状伪足和较多的膜皱褶结构,应力纤维数量减少.提示 *ibeB* 基因表达可以促进由网状排列的肌动蛋白纤维组成的片状伪足的形成,即 IbeB 蛋白通过调节 HeLa 细胞微丝的重新组装来引起 HeLa 细胞片状伪足的形成,而 IbeB 蛋白调控微丝组装的分子机制则是我们下一步研究的内容.

已有文献表明,贴壁型生长的细胞在与底物接触后,细胞在向外伸展的同时,与底物形成粘着斑

结构,进而产生张力促进细胞片状伪足的形成^[13],其中 Vinculin 在促进粘着斑的形成及片状伪足的延伸过程中起重要作用^[9,14].本研究发现,转染 *ibeB* 基因的 HeLa 细胞对底物的粘附能力增强, Vinculin 向细胞边缘聚集,呈现出典型的斑块状粘着斑结构.提示, IbeB 蛋白可能在调控 Vinculin 的亚细胞分布过程中起重要作用, Vinculin 在细胞边缘的再分布使细胞伸出的片状伪足结构更为稳定.

愈来愈多的研究表明,片状伪足参与了细胞的许多重要生命活动,如细胞的粘附、运动和吞噬过程,以及肿瘤细胞的侵袭等^[7,12].迄今片状伪足的形成机制尚不完全清楚.本研究为探讨片状伪足的形成机制提供了新模型.

参 考 文 献

- 1 杨锡强,易著文,沈晓明,等.儿科学.第6版.北京:人民卫生出版社,2003.458~463
Yang X Q, Yi Z W, Shen X M, et al. Pediatrics. 6th. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 2003. 458~463
- 2 Huang S H, Chen Y H, Fu Q, et al. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. Infect Immun, 1999, **67** (5): 2103~2109
- 3 赵伟东,陈誉华.大肠杆菌脑微血管内皮细胞侵袭基因 *ibeB* 的编码产物为外膜蛋白前体.中国生物化学与分子生物学报, 2004, **20** (4): 497~501
Zhao W D, Chen Y H. Chin J Biochem Mol Biol, 2004, **20** (4): 497~501
- 4 Arthur W T, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. Mol Biol Cell, 2001, **12** (9): 2711~2720
- 5 Attwell S, Mills J, Troussard A, et al. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. Mol Biol Cell, 2003, **14** (12): 4813~4825
- 6 翟中和.细胞生物学.北京:高等教育出版社,2000.77~78
Zhai Z H. Cell Biology. Beijing: China Higher Education Press, 2000. 77~78
- 7 Small J V, Stradal T, Vignat E, et al. The lamellipodium: where motility begins. Trends Cell Biol, 2002, **12** (3): 112~120
- 8 Geiger B, Mershadsky A, Pankov R, et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, **2** (11): 793~805
- 9 Critchley D R. Focal adhesions-the cytoskeletal connection. Curr Opin Cell Biol, 2000, **12** (1): 133~139
- 10 Gruenheid S, Finlay B B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. Nature, 2003, **422** (6933): 775~781
- 11 Taylor K A, Luther P W, Donnenberg M S. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. Infect Immun, 1999, **67** (1): 120~125
- 12 Small J V, Rottner K, Kaverina I, et al. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. Biochim Biophys Acta. 1998, **1404** (3): 271~281
- 13 Fukata M, Nakagawa M, Kuroda S, et al. Cell adhesion and Rho small GTPases. J Cell Sci, 1999, **112** (24): 4491~4500
- 14 Sastry S K, Burridge K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. Exp Cell Res, 2000, **261**: 25~36

Expression of *ibeB*, an Invasion Gene of *E.coli* Contributing to Crossing of The Blood-brain Barrier, Triggers Lamellipodial Protrusion in HeLa Cells*

ZHAO Wei-Dong, CHEN Yu-Hua**

(Department of Developmental Biology, China Medical University, Key Laboratory of Cell Biology,
Ministry of Public Health, Shenyang 110001, China)

Abstract Several *E.coli* determinants contributing to invasion of brain microvascular endothelial cells (BMEC) had been previously identified *in vitro*, including *ibeB* gene. In order to further characterize the role of the invasion locus *ibeB* in the absence of other *E.coli* K1 factors, the *ibeB* gene was subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1/HisC and transfected into HeLa cells. As a result, the HeLa cells expressing *ibeB* showed dramatic morphological changes comparing to the control, such as the obvious lamellipodial protrusions and membrane ruffles at the periphery of cells due to filamentous actin rearrangement. Cell-substratum adhesion ability and cell spreading ability of *ibeB*-transfected HeLa cells were increased. Furthermore, *ibeB* could promote the aggregation of vinculin, which play a key role during focal adhesion formation. This first report provides experimental proof to probe the function of *ibeB* in the process of *E.coli* K1 invasion and the mechanism of lamellipodial protrusion.

Key words *ibeB*, *Escherichia coli*, HeLa, cytoskeleton, lamellipodia

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30170053, 30170470, 30370702).

**Corresponding author. Tel: 86-24-23260246, 86-24-23256666-5019, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

Received: September 17, 2004 Accepted: October 30, 2004